战骨黄酮碳苷类化合物的大孔树脂富集工艺研究[1]

党骄阳[1,2]，陈月圆[2]，颜小捷[2]，卢凤来[2]，李霞[1]，李典鹏[2*]

（1. 桂林理工大学 化学与生物工程学院，广西 桂林 541006；2. 广西植物功能物质研究与利用重点实验室/广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所，广西 桂林 541006）

摘 要：黄酮碳苷，作为战骨植物中的有效成分之一，具有抗骨关节炎的功效。本实验旨在优选植物战骨茎中总黄酮碳苷的富集纯化工艺。以战骨中 5 个黄酮碳苷为考察指标，通过对 13 种大孔树脂的静态吸附与解吸实验，优选出合适的大孔树脂，利用高效液相色谱图对结果进行检测，然后利用正交工艺优化富集纯化条件。结果表明 XAD-16N 型大孔树脂对植物战骨茎中黄酮碳苷具有较好的吸附和解吸效果，通过单因素筛选及正交工艺优化，最终确定其最佳富集纯化工艺为：上样浓度为原提取液稀释 0.5 倍、上样流速 2 BV·h^{-1}、洗脱液浓度 60 %乙醇。总黄酮碳苷的含量由 1.73 %（原植物中含量）提高到 14.50 %，提高 7.38 倍。说明优选的提取工艺稳定可行，筛选的大孔树脂富集纯化效果良好，为植物战骨茎的药物开发提供数据参考。

关键词：战骨，黄酮碳苷，大孔树脂，正交试验

中图分类号：　　　　**文献标识码**：A

文章编号：

Purification technology of total flavonoid-*C*- glycosides of *Premna fulva* by macroporous resin

DANG Jiaoyang[1,2], CHEN Yueyuan[2], YAN Xiaojie[2], LU Fenglai[2], LI Xia[1], LI Dianpeng[2*]

(1. *College of Chemistry and Bioengineering, Guilin University of Technology*, Guilin 541006，China；

2. *Guangxi Institute of Botany, Chinese Academy of Science, Guangxi Zhuang Autonomous Region/Guangxi Key Laboratory of functional Phytochemicals Research and Utilization*, Guilin 541006，China)

Abstract: Flavonoid-*C*- glycosides, as one of the effective components in *Premna fulva*, have the effect of antigen-induced arthritis. The enrichment and purification process of five flavonoid-*C*-glycosides as in *P. fulva* stems is preferred. Through static adsorption and desorption experiments on 13 kinds of macroporous resins with five flavonoid-*C*- glycosides in *P. fulva* stems as the index,

---

收稿日期：**2020-12-02**

基金项目：广西创新驱动发展专项(桂科 AA18118015)；广西自然科学基金项目(2018GXNSFAA294031)；中央引导地方科技发展专项（桂科 ZY20111010）[Supported by Innovation-Driven Development Special Fund Project of Guangxi(AA18118015); Natural Science Foundation of Guangxi(2018GXNSFAA294031); the Special Funds for Local Science and Technology Development Guided by the Central Committee(ZY20111010)]。

作者简介：党骄阳(1996-)，男，陕西省渭南人，硕士研究生，研究方向为药物研发与转化，（E-mail）545121289@qq.com。

***通信作者**：李典鹏，博士，研究员，主要从事植物化学研究，（E-mail）ldp@gxib.cn。

a suitable macroporous resin was selected, and the results were tested by the HPLC, and then the orthogonal process was used to optimize the enrichment and purification conditions. The results showed that XAD-16N macroporous resin has a good adsorption and desorption effect on the five flavonoid -*C*-glycosides in *P. fulva* stems. Through single factor screening and orthogonal process optimization, the best enrichment and purification process is finally determined as follows: the loading concentration is 0.5 times the original extract diluted, the loading flow rate is 2 BV·h^{-1}, and the eluent concentration is 60 % ethanol. The content of five flavonoid-*C*-glycosides increased from 1.73 % (in the original plant) to 14.5 %, an increase of 7.38 times. The results showed that the selected extraction process is stable and feasible, and the selected macroporous resin has a good separation and purification effect, which provides a reference for the drug development of *P. fulva* stems.

Key words: *Premna fulva*, flavonoid-*C*- glycosides, macroporous resin, orthogonal process

战骨又名黄毛豆腐柴（*Premna fulva* Craib），马鞭草科豆腐柴属植物，其根、茎、叶均可以入药。分布于广西南宁、龙州平果等地(戴春燕等，2007；史艳财等，2010)。具有祛风止痛等功效，民间常用于腰腿疼痛、跌打扭伤、风湿性和类风湿性关节炎等，是广西的地道药材（蒋才武等，2004）。战骨作为广西道地药材，药用历史悠久。文献调研发现对战骨的研究主要集中在化学成分（吴雪莉等，2016；潘洪平，2002）、药理（叶勇等，2018）、及相关制剂的药效、临床研究（陈苍海，2018）等方面。文献（方刚，2018）明确战骨的主要成分为柚皮素等黄酮类化合物，并对黄酮类成研究进行了提取工艺研究（李小燕等，2005）。最新研究发现以战骨为原料的单方制剂产品健骨注射液的抗骨关节炎的功效成分主要为5个黄酮碳苷（CHEN et al.，2019）。且最近文献报道基于UFLC-Triple TOF-MS/MS技术，从战骨植物中指认出18个黄酮碳苷类化合物异构体（梁玉婷等，2018），说明战骨植物中含有丰富的碳苷黄酮。战骨中黄酮碳苷的提取采用天然低共熔溶剂（NADESs）可高效提取黄酮碳苷（陈月圆等，2020），总黄酮碳苷实际得率为17.37 mg·g^{-1}，显著高于现有传统有机溶剂提取工艺（13.70 mg·g^{-1}）。遗憾的是，该黄酮碳苷类提取物中仍普遍含有萜类、多糖、蛋白质、木脂素等多种杂质，严重制约了黄酮碳苷类化合物的实际应用。本文建立了富集战骨中黄酮碳苷类化合物的纯化方法，黄酮碳苷类化合物作为战骨植物中的主要功效成分，为了进一步开发和利用战骨中的黄酮碳苷类化合物，及现有产品制剂（如健骨注射液）的二次开发和利用，故开发一种有效的方法来生产高纯度的战骨黄酮碳苷类化合物是非常必要的。

大孔树脂作为一种有机高聚物吸附剂，具有吸附性好、选择性强、吸附速度快、可重复用利用的特点，已广泛应用于黄酮类成分的分离纯化以及化学医药等领域（刘丹等，2016；汪洪武和刘艳清，2005）。战骨黄酮碳苷的NADESs提取液能否运用大孔树脂富集纯化研究未见报道，故本文采用大孔树脂法对战骨植物中的5个黄酮碳苷的NADESs提取液进行富集纯化研究。通过比较13种大孔树脂对战骨植物中5个总黄酮碳苷的吸附效率，筛选出了一种对战骨具有高吸附分离效率的树脂，通过单因素实验及正交试验对该树脂的工艺条件进行了优化。

1 材料与方法

1.1 材料与实验仪器

战骨购于广西玉林药材市场，经广西植物研究所唐辉研究员鉴定为马鞭草科豆腐柴属植物黄毛豆腐柴 *Premna fulva* Craib 的根茎。凭证样品保存于广西植物功能物质研究与利用重点实验室。

5 个黄酮碳苷对照品（芹菜素-6，8-二-*C*-*β*-*D*-葡萄糖苷、芹菜素-6-*C*-*β*-*D*-木糖-8-*C*-*β*-*D*-葡萄糖苷、芹菜素-6-*C*-*β*-*D*-木糖-8-C-β-D-半乳糖苷、芹菜素-6-*C*-*β*-*D*-葡萄糖-8-*C*-*β*-*D*-木糖苷和芹菜素-6-*C*-*β*-*D*-半乳糖-8-*C*-*β*-*D*-木糖苷)，实验室自制，纯度>95 %；大孔树脂 HPD-750、HPD-BJQH、HPD-100、D296、LSA-700B、LX-T5、NKA、XAD-16N，赛普锐斯（北京）科技有限公司；FPA53，北京慧德易科技有限公司；LX-38、LX-T28、LX-60，西安蓝晓科技新材料股份有限公司；D101，沧州宝恩吸附材料科技有限公司；氯化胆碱，郑州超凡化工有限公司；1，3-丙二醇，山东绿健生物技术有限公司；甲醇为色谱纯，安徽天地高纯溶剂有限公司；娃哈哈饮用纯净水，杭州娃哈哈集团有限公司。

岛津 LC-2030C 型液相色谱仪，岛津企业管理（中国）有限公司；仪器 JP-040 型数控超声波清洗器，深圳市洁盟清洗设备有限公司；LQ-A10002 型电子天平，瑞安市安特称重设备有限公司；N-1300 旋转蒸发仪，上海爱朗仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 对照品的制备

将战骨的茎打成粉末，用 40 %乙醇浸泡两周，将提取液浓缩后，经大孔树脂、C18、MCI 等柱材料分离划段，得到富含 5 个黄酮碳苷的部位，最后按照文献（CHEN et al.，2019）的方法，采用循环高速逆流色谱法成功得到 5 个黄酮碳苷对照品，测定方法按 1.2.3。

1.2.2 战骨 NADESs 提取液的制备

根据课题组前期优化的战骨绿色提取溶剂天然深共晶溶剂（NADESs）的提取工艺（陈月圆等，2020），取干燥的战骨粉末适量过筛（80 目），按照专利的方法提取战骨茎总黄酮碳苷，收集上清液，备用。

1.2.3 色谱条件及对照品溶液的配制

色谱条件　Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；柱温 30 ℃；流动相 0.1 %甲酸水溶液（A）-甲醇（B）；梯度洗脱程序：0-20 min，10 %-30 %B；20-45 min，30%-40 %B；流速 1.0 mL·min^{-1}；检测波长 280 nm；进样量 20 μL。

标准溶液的配置　分别精确称取一定质量的 5 个对照品 7.6、5.1、7.2、5.7、2.8 mg，用无水乙醇在 10 mL 的容量瓶中定容，制成浓度为 0.760、0.516 、0.726、0.576、0.286 mg·mL^{-1} 的储备液。分别将 5 个储备液稀释一定的倍数。进 5、10、15、20 μL 的体积进行液相分析。

1.2.4 标准曲线的建立

采用外标法定量，以色谱峰面积（Y）为纵坐标，对照品浓度（X，μg·mL^{-1}）为横坐标，进行线性回归分析，得到标准曲线回归方程。将最低浓度标准工作溶液重复进样 10 次，计算标准偏差，分别以 3 倍和 10 倍标准偏差为方法的检出限（LOD）和定量限（LOQ），结果见表 1。可以看出，方法的线性良好，且灵敏度较高。

表 1 5 个黄酮碳苷化合物的标准曲线

Table 1 Standard curve of five flavonoid-*C*- glycosides compounds

化合物 Compound	标准曲线 Standard curve line	R^2	检出限 LOD (μg•mL^{-1})	定量限 LOQ (μg•mL^{-1})

芹菜素-6，8-二-*C*-*β*-*D*-葡萄糖苷（1） Apigenin6,8-di-*C*-*β*-*D*-glucopyranoside（1）	*Y*=10 000 000*X*+81 351	0.9992	0.018	0.054
芹菜素-6-*C*-*β*-*D*-木糖-8-*C*-*β*-*D*-葡萄糖苷（2） Apigenin6-*C*-*β*-*D*-xylopyranosyl-8- *C*-*β*-*D* -glucopyranoside（2）	*Y*=4 466 420*X*-6 968.9	0.9977	0.014	0.043
芹菜素-6-*C*-*β*-*D*-木糖-8-*C*-*β*-*D*-半乳糖苷（3） Apigenin6-*C*-*β*-*D*-xylopyranosyl-8- *C*-*β*-*D*-galactopyranoside **(3)**	*Y*=7 239 770*X*-154 149	0.9936	0.024	0.072
芹菜素-6-*C*-*β*-*D*-葡萄糖-8-*C*-*β*-*D*-木糖苷（4） Apigenin6-*C*-*β*-*D*-glucopyranosyl-8-*C*-*β*-*D* -xylopyranoside（4）	*Y*=3 091 590*X*-5 670.3	0.9918	0.019	0.057
芹菜素-6-*C*-*β*-*D*-半乳糖-8-*C*-*β*-*D*-木糖苷（5） Apigenin-6-*C*-*β*-*D*-galactopyranosyl-8-*C*-*β*-*D* -xylopyranoside（5）	*Y*=8 174 940*X*+15 891	0.9998	0.006	0.018

注：LOD=检出限；LOQ=定量限。

Note：LOD=limit of detection；LOQ=limit of quantification.

1.2.5 大孔树脂的选择

1.2.5.1 大孔树脂的预处理

分别称取一定量 HPD-750，HPD-BJQ，HPD-100，D296，LSA-700B，LX-T5，NKA，XAD-16N，FPA53，LX-38，LX-T28，LX-60 和 D101 共 13 种大孔树脂，用乙醇浸泡 24 小时，用蒸馏水反复清洗至无味，备用。

1.2.5.2 静态吸附性能

选择上述预处理好的大孔树脂各 50 g，分别置于 500 mL 锥形瓶中，各加入 250 mL 的提取液，25 ℃下恒温恒速振荡吸附 24 h，抽滤，每组做 3 个平行实验，取滤液测定 5 个黄酮碳苷的总质量。然后用去离子水清洗 3 次树脂，用滤纸将树脂表面的水分吸干，转入 500 mL 锥形瓶中，加入 80 %的乙醇 250 mL，于 25 ℃下恒温恒速振荡解吸 12 h，取上清液测定 5 个总黄酮的总质量，按照下列公式计算吸附率与解吸率，比较静态吸附性能，从 13 种树脂中晒筛出吸附性能最佳的树脂。

$$\text{吸附率}(\%) = \frac{\text{原液中 5 个黄酮碳苷总质量} - \text{吸附后滤液中 5 个黄酮碳苷总质量}}{\text{原液 5 个黄酮碳苷总质量}}$$

$$\text{吸附率}(\%) = \frac{\text{解吸后溶液中 5 个黄酮碳苷的总质量}}{\text{树脂吸附的 5 个黄酮碳苷总质量}}$$

1.2.6 泄露曲线的绘制

根据 1.2.5.2 的筛选结果，将大孔树脂预处理好后，湿法装样，取提取液原液上柱，每份 60 mL，以固定的流速进行动态吸附，分别接出每一份流出液，测出流出液中 5 个黄酮碳苷的含量，绘制泄露曲线。

1.2.7 单因素实验及正交优化实验

按照 1.2.2 下提取液的制备方法，制备提取液。以吸附率和解吸率作为综合考查的指标，在其他因素相同的情况下，分别考查提取液上样浓度（原提取液稀释 1 倍、稀释 0.5 倍、原液（0 倍））、上样速度（1、2、3 BV·h^{-1}）、洗脱液浓度（50 %、60 %、70 %、80 %乙醇）、洗脱液用量（1、2、3 BV）对吸附率和解吸率的影响。

根据单因素实验的筛选结果，从提取液上样浓度、上样速度、洗脱液浓度、洗脱液用量中筛选出上样浓度、上样流速、洗脱液浓度 3 个影响较大的因素为自变量，考察战骨中 5 个主要活性黄酮碳苷在树脂中的总解吸率及在洗脱液中的含量为指标，设计 L_9组(3^4)正交试验，正交试验因素与水平见表 2。总解吸率及含量按照下式计算。

$$解吸率(\%)=\frac{洗脱液中\ 5\ 个活性黄酮碳苷的质量}{原液\ 5\ 个黄酮碳苷总质量战骨提取物中总黄酮碳苷在树脂中的总吸附质量}$$

$$含量=\frac{洗脱液中总黄酮碳苷的质量}{洗脱液总质量}$$

表 2 因素水平

Table 2 Factor level

水平 Level	A 上样浓度 Loading concentration （g·mL^{-1}）	B 上样流速 Sample flow rate （BV·h^{-1}）	C 洗脱液浓度 Eluent concentration （%）
1	1	1	50
2	0.5	2	60
3	2	3	70

2. 结果与分析

2.1 树脂静态吸附性能比较

静态吸附结果（如图 1）表明：战骨 5 个黄酮碳苷的静态吸附率较优的树脂为 XAD-16N（87.3 %）、LX-60（83.5 %）、LX-T28（81.9 %），树脂间差异性不显著（P>0.05）。其次，D296 和 LSA-700B 对战骨 5 个黄酮碳苷的静态吸附率也较好（81.71 %，82.00 %），但是两者的解吸率只有 1.44 %、1.03 %，其原因为这两类树脂为脱色型树脂，其吸附量用酸和碱均无法将其洗脱。LX-T5、FPA53 两个树脂吸附性能和解吸性能相对都比较差，吸附率和解吸率都比较低。尤为重要的是，与现有战骨制剂健骨注射液工业处理的树脂 D101 相比（王静宇，杜日建，2014），XAD-16N（87.3 %）、LX-60（83.5 %）、LX-T28（81.9 %）三种树脂吸附率均显著优于 D101（74.30 %），而 4 种树脂在静态解吸率上均无显著差异。故接下来我们采用动态吸附和解吸考察此 4 种树脂的泄露曲线。

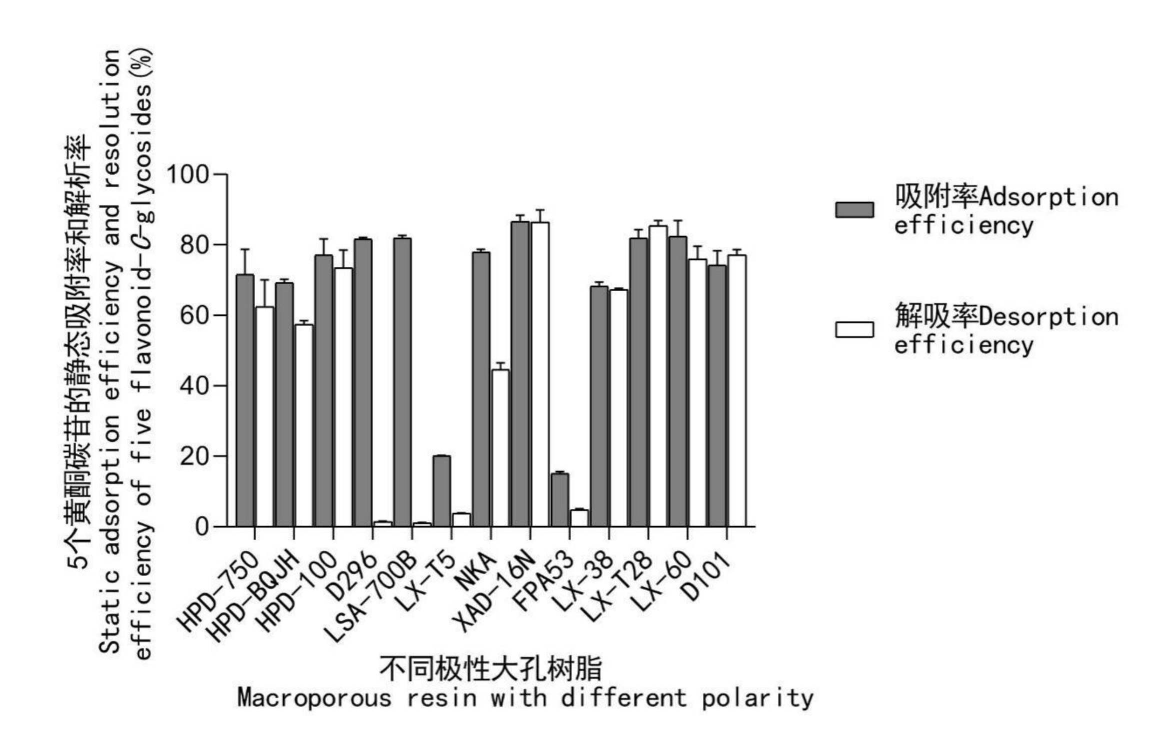


图 1 不同极性大孔树脂对战骨 5 个总黄酮碳苷的静态吸附率和解吸率比较

Fig.1 Comparison of the static adsorption efficiency and desorption efficiency of different polar macroporous resins on five flavonoid-*C*-glycosides

2.2 吸附泄露曲线

分别绘制 XAD-16N，LX-T28，LX-60，D101 大孔树脂的泄露曲线，由图 2 可知，随着上样量的增加，5 个黄酮碳苷的泄漏量逐渐增加，当份数增大到动态饱和吸附时，泄露量增加的趋势明显上升，即大孔树脂达到动态饱和吸附。不同树脂对战骨植物 5 个黄酮碳苷的吸附量有所差异，泄漏量也有所不同。其中 XAD-16N 的泄漏量最少吸附量最多，其次是 D101，接着是 LX-T28，而 LX-60 树脂的吸附量最低，因此选用 XAD-16N 做动态吸附试验。

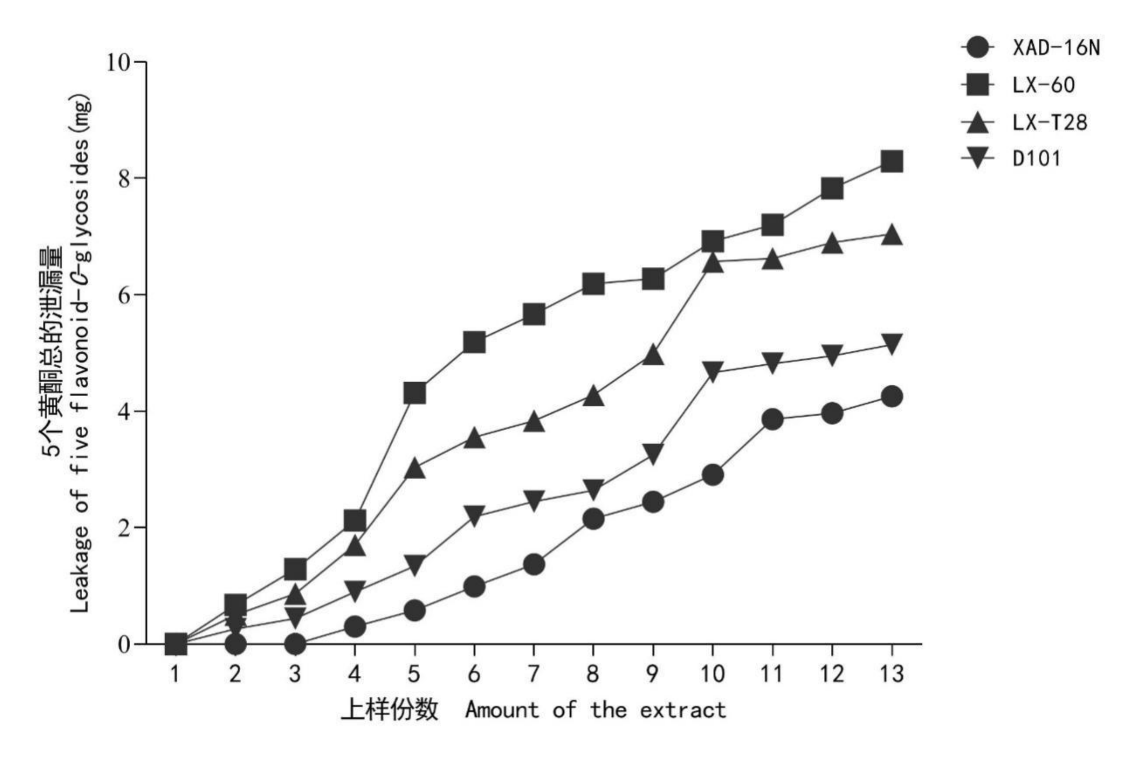


图 2 战骨黄酮碳苷提取液的泄露曲线

Fig.2 Leakage curve of five flavone–*C*-glycosides from *Premna fulva* Craib

2.3 战骨黄酮碳苷优化工艺

2.3.1 提取液上样浓度

上柱液浓度分别为原提取液稀释 1 倍、稀释 0.5 倍、原液（0 倍），每份 100 mL，分别以 2 BV·h^{-1}（每小时 2 倍柱体积）的流速通过 XAD-16N 型大孔树脂，用纯水洗脱至流出液为无色，收集过柱液，用 710 %乙醇洗脱 3 BV，收集洗脱液。每组实验做 3 个平行，按 2.2 下测定 5 个黄酮碳苷的总含量，计算 5 个黄酮碳苷的总吸附率和总解吸率，从表 3 可以看出原液稀释 1 倍与原液稀释 0.5 倍两者的吸附率都是 100 %，而使用原液上样时，吸附率却只有 67.3 %，而解吸率原液和原液稀释 1 倍差异性不显著，原液稀释 0.5 倍最小，综上考虑故确定上样浓度为原液稀释 1 倍。

表 3 提取液上样浓度对战骨 5 个黄酮碳苷吸附率和解吸率的影响

Table 3 Effect of sample concentration on adsorption efficiency and desorption efficiency of five flavonoid-*C*-glycosides from *Premna fulva* Craib

上柱液浓度 Concentration of column liquid	吸附率 Adsorption rate（%）	解吸率 Desorption rate（%）
原液稀释 1 倍 Dilute the solution twice	100	93.4
原液稀释 0.5 倍 Dilute the solution 0.5 times	100	85.2
原液 Stock Solution	67.3	94.6

2.3.2 上样速度

根据 2.3.1 的筛选结果，固定上柱液浓度（原液稀释 1 倍），如表 4 所示，表示了不同的上样流速对战骨植物总黄酮在 XAD-16N 型大孔树脂中吸附率和解吸率的影响，上样流速

为 1、2 BV·h^{-1} 是吸附率差异不大，3 BV·h^{-1} 时吸附率显著下降，而解吸率随着上样流速的增大逐渐变小，综合考虑确定上样流速为 1 BV·h^{-1}。

表 4 不同上样速度对纯化战骨 5 个黄酮碳苷吸附率和解吸率的影响

Table 4 Effect of flow velocity on adsorption efficiency and desorption efficiency of five flavonoid-*C*-glycosides from *Premna fulva* Craib

上样流速 Sample flow rate（BV·h^{-1}）	吸附率 Adsorption rate（%）	解吸率 Desorption rate（%）
1	100	97.9
2	100	86.1
3	81.2	85.3

2.3.3 洗脱液浓度

取浓度为原液稀释 1 倍上柱液的 4 份，每份 100 mL，以 1 BV·h^{-1} 的流速通过 XAD-16N 型大孔树脂，用纯水洗脱至流出液为无色，收集过柱液，分别用 50 %、60 %、70 %、80 % 的乙醇洗脱 3 BV，收集洗脱液，测定洗脱液中总黄酮的含量，如表 5 所示，可以看出 4 个浓度下的吸附率都是一样的，但是解吸率随着浓度的增加也逐渐增大，当洗脱液浓度为 70 % 与 80 %的时候，解吸率达到差异不显著。因此从节约溶剂的角度考虑，最终确定洗脱液的浓度为 70 %。

表 5 不同洗脱液浓度对纯化战骨 5 个黄酮碳苷吸附率和解吸率的影响

Table5 Effects of different concentrations of ethanol on adsorption efficiency and desorption efficiency of five flavonoid-*C*-glycosides from *Premna fulva* Craib

洗脱液浓度 Eluent concentration（%）	吸附率 Adsorption rate（%）	解吸率 Desorption rate（%）
50	100	78.7
60	100	87.7
70	100	94.3
80	100	91.4

2.3.4 洗脱液用量

按照经单因素考察后的 2.5.3 项下方法，饱和吸附后，用纯水洗脱至流出液为无色，分别然后用 70 %的乙醇溶液洗脱 1、2、3、4 BV，收集洗脱液。每组实验做 3 个平行，按 2.2 下测定 5 个黄酮碳苷的总含量，计算 5 个黄酮碳苷的总吸附率和总解吸率，由表 6 可知，洗脱液用量为 1 BV 的时候解吸率最小只有 81.2 %，随着洗脱液体积的增大，解吸率液逐渐增大，当洗脱液用量为 4 BV 时解吸率达到最大 98.6 %，说明少体积洗脱液并不能将黄酮碳苷全部洗脱，而洗脱液用量为 3 BV 时解吸率为 95.9 %，与 4 BV 相差不大，从节约溶剂的角度考虑，最终确定洗脱液用量为 3 BV。

表 6 不同洗脱液用量对纯化战骨 5 个黄酮碳苷吸附率和解吸率的影响

Table 6 Effect of different ethanol volume on adsorption efficiency and desorption efficiency of five flavonoid-*C*-glycosides from *Premna fulva* Craib

洗脱液用量 Eluent dosage（BV）	吸附率 Adsorption rate（%）	解吸率 Desorption rate（%）
1	100	81.2
2	100	89.3
3	100	95.9

4	100	98.6

2.3.5 正交试验

根据单因素实验的结果，按照表 2 的正交试验设计，试验结果见表 7，由极差分析结果可知，树脂 XAD-16N 影响纯化战骨植物中 5 个黄酮碳苷的工艺因素依次为 B > C >A，即上样流速>洗脱液浓度 >上样浓度。由表 8 的方差分析结果可知，因素 A、B、C 均无显著影响（P>0.05）。战骨植物中 5 个黄酮碳苷提取理论最优水平为 A_2、B_2、C_2，即上样浓度为原液稀释 0.5 倍、上样流速 2 BV·h^{-1}、洗脱液浓度 60 %乙醇。

表 7 实验设计及结果

Table 7 Experimental design and results

序号 Serial number	因素 Factor			含量 Content（%）
	A	B	C	
1	1	1	50	7.2025
2	1	2	60	12.7252
3	1	3	70	7.3299
4	0.5	1	60	12.2688
5	0.5	2	70	9.5545
6	0.5	3	50	8.2671
7	2	1	70	12.6904
8	2	2	50	10.2628
9	2	3	60	5.7357
K_1	9.086	10.721	8.577	-
K_2	10.030	10.847	10.243	-
K_3	9.563	7.111	9.858	-
R	0.944	3.736	1.666	-

表 8 方差分析

Table 8 Variance analysis

方差来源 Source of Variance	偏差平方和 Deviation square sum	自由度 Degree of freedom	F 比 F ratio	F 临界值 F critical value	P 值 P value
A	1.338	2	0.062	19.000	>0.05
B	27.008	2	1.252	19.000	>0.05
C	4.563	2	0.212	19.000	>0.05
F(误差) F (error)	21.57	2	-	-	-

2.4 验证试验

采用 2.3.5 项下最优工艺进行 3 次验证试验，结果见表 9。由表 9 可知，总 5 个黄酮碳苷的含量 14.5 %，而由原植物提取液中 5 个黄酮碳苷的含量为 1.73 %，实验结果确证筛选得到的大孔树脂（XAD-16N）富集纯化效果良好。

表 9 验证试验结果（n= 3）
Table 9 Verification test results (n = 3)

指标 Index（%）	试验号 Test number 1	2	3	平均值±SD Average value
总黄酮碳苷解吸率 Desorption rate of five flavonoid-*C*-glycosides	90.55	97.35	91.25	93.05±3.74
总黄酮碳苷的含量 Content of five flavonoid-*C*-glycosides	14.27	14.91	14.32	14.50±0.36

3 讨论与结论

大孔树脂具有高交联度和多永久性孔隙的特性，广被用于黄酮类化合物的分离和提纯。大孔树脂能从植物提取物中分离黄酮类化合物的优势是由于黄酮类化合物本身的特殊特性，因为它们的苷元上有苯环和几个氢基，有助于具有适当的平均孔径、极性和表面积适当的大孔吸附树脂吸附这些化合物。结果表明，XAD-16N 作为理想树脂用于战骨中黄酮碳苷提取液（天然深共晶溶剂作为提取媒介）的富集纯化的吸附和解吸能力最强，说明大孔树脂的大孔径(560-710 μm)、大比表面积（800 $m^2 \cdot g^{-1}$)和苯乙烯系基质最适合于战骨提取物中黄酮碳苷的吸附和释放。故战骨提取物大极性的黄酮碳苷与大极性树脂之间的极性匹配主要归因于氢键和范德华相互作用。

乙醇是一种有机溶剂，它具有易于从溶液中去除、可回收、价格低廉、毒性低等优点而对人类使用是安全的。因此，本研究选择它作为脱附剂。实验结果表明，黄酮碳苷类化合物的解吸率与乙醇浓度成正比，这意味着随着解吸率的增加，乙醇浓度也会增加。达到峰值后，解吸率随乙醇浓度的进一步增加而趋于平缓。吸附在树脂上的分子间作用力与溶解在溶剂中的分子间相互作用对黄酮碳苷类化合物从树脂上的解吸起着重要的作用。结果表明，在乙醇浓度为 60 %时，解吸率最高。更重要的是，XAD-16N 成功地富集了战骨中存在的黄酮碳苷类化合物，并选择性地吸附黄酮碳苷类化合物。与传统的纯化工艺（D101）相比，树脂 XAD-16N 的吸附率(86.65 %)和解吸率(86.54 %)，均显著优于 D101(吸附率 74.30 %，解吸率 77.21 %)。本研究通过单因素筛选及正交工艺优化，最终确定其最佳富集纯化工艺为：上样浓度为原提取液稀释 0.5 倍、上样流速 2 $BV \cdot h^{-1}$、洗脱液为 60 %乙醇。总黄酮碳苷的含量由 1.73 %（原植物中含量）提高到 14.50 %，提高 7.38 倍。因此，本研究开发了一种简单有效的从战骨植物中提取黄酮碳苷的方法。该方法操作简单，回收率高，工艺稳定可行，可为今后战骨工业大批量生产提供一定的参考价值。

参考文献：

CHEN YY, YAN XJ, LU FL, et al., 2019. Preparation of flavonedi-*C*-glycoside isomers from Jian-Gu injection (*Premna fulva* Craib.) using recycling counter-current chromatography[J]. J Chromatogr A, (1599): 180-186.

CHEN Z, HAO LD, ZHONG W, 2016. Clinical efficacy of pain spot injection with Jiangu

injection in acute lumbar sprain[J]. J Guangdong Med Univ, 34(3): 295-297. [陈宙，郝林端，钟文，2016．健骨注射液痛点注射治疗急性腰扭伤的临床观察[J]．广东医学院学报，34(3)：295-297.]

CHEN CH, 2018. Clinical observation on treatment of knee osteoarthritis with acupotomy combined with manipulation and Jiangu injection[J]. Chin Manipul Rehabil Med, 9(6): 53-54. [陈苍海，2018．针刀结合手法与健骨注射液治疗膝关节骨关节炎的临床观察[J]．按摩与康复医学，9(6)：53-54.]

CHEN YY, DANG JY, YAN XJ et al., 2020-05-19. Deep eutectic solvent and method for extracting flavone diglycoside from *Premna fulva* Craib[P]. CN：111171095A . [陈月圆，党骄阳，颜小捷，等，2020-05-19．深共晶溶剂及从战骨中提取黄酮二糖碳苷的方法[P]．广西壮族自治区：CN：111171095A.

DAI CY, CHEN GY, ZHU GY, et al., 2007. Study on the chemical constituents of *Premna fulva* Craib[J]. Chin Trad Herb Drug, 38(1): 34-35. [戴春燕，陈光英，朱国元，等，2007．战骨茎的化学成分研究[J]．中草药，38(1)：34-35.]

FANG G, 2018. General situation and progress of research on *Premna fulva* Craib in recent 8 years[J]. Mod Med Health Res, 2(6):136-137. [方刚，2018．壮药战骨近 8 年研究概况与进展[J]．现代医学与健康研究电子杂志，2(6)：136-137.]

JIANG CW, ZENG CH, LIU SY, 2004. Characters and microscopic identification of *Premna fulva* Craib[J]. J Chin Med Mater, 27(11): 811-813. 蒋才武，曾春晖，刘寿养，2004．壮族药战骨的性状与显微鉴别[J]．中药材，27(11)：811-813.]

LIANG YT, WANG JY, SU WW, et al., 2018. Chemical constituents of *Premna fulva* Craib by UFLC-Triple TOF-MS/MS[J]. Cent S Pharm, 16(10)：1369-1373.[梁玉婷，王静宇，苏薇薇，等，2018．基于 UFLC-Triple TOF-MS/MS 的壮药战骨化学成分分析[J]．中南药学,，16(10)：1369-1373.]

LI XY, LUO WQ, YANG LF et al., 2005. Studies on the Process for Extraction of *Premna Fulva* Craib by Orthogonal Experiments[J]. J Guangxi Univ Nationalities(Nat Sci Ed), 11(4): 121-123+128. [李小燕，罗伟强，杨立芳，等，2005．正交实验研究壮药战骨中黄酮类化合物的提取工艺[J]．广西民族学院学报(自然科学版)，11(4)：121-123+128.]

LIU D, WU YH, LIU H et al., 2016, Application of macroporous adsorptive resins in separation and purification of natural products[J]. Chin Trad Herb Drug, 47(15): 2764-2770. [刘丹，吴叶红，李玮桓，等，2016．大孔吸附树脂在天然产物分离纯化中的应用[J]．中草药，47(15)：2764-2770.]

PAN HP, 2002. Progress in chemical constituents, pharmacological research and clinical application of *Premna fulva* Craib[J]. Guangxi Med J, 24(3): 365-367. [潘洪平，2002．黄毛豆腐柴化学成分、药理研究及临床应用进展[J]．广西医学，24(3)：365-367.]

SHI YC, WEI JQ, JIANG YS, et al., 2010. Extraction Condition and Quantitative Analysis of Flavonoid in Different Sections of *Premna fulva* Craib[J]. J Guangxi Normal Univ: Natl Sci Ed, 28(2): 57-60. [史艳财，韦记青，蒋运生，等，2010．战骨总黄酮提取工艺及不同部位含量测定研究[J]．广西师范大学学报(自然科学版)，28(2)：57-60.]

WU XL, QI CL, WANG H, et al., 2016. A new flavonoid glycoside from the stem barks of *Premna fulva*[J]. J Chin Pharm Univ, 47(6): 678-682. [吴雪莉，戚楚露，汪豪，等，2016．战骨中一个新的黄酮苷类成分[J]．中国药科大学学报，47(6)：678-682.]

WANG HW, LIU YQ, 2005. Research Progress in the Application of Macroporous Adsorption Resins[J]. J Chin Med Mater, 28(4): 353-356. [汪洪武，刘艳清，2005．大孔吸附树脂的应用

研究进展[J]．中药材，28(4)：353-356.]
WANG JY, DU RJ,2014-04-09. An improved method for the production process of Jiangu injection[P]. CN：103705652A. [王静宇，杜日建，2014-04-09．一种健骨注射液生产工艺的改进方法[P]．CN：103705652A.]
YE Y, TAN N, YU Q, et al., 2018. Study on anti-inflammatory and analgesic effects of total flavonoids extract of Zhuang medicine *Premna fulva* for Rats/Mice by transdermal administration[J]. Chin Pharm, 29(15): 2090-2094.[叶勇，覃妮，庾茜，等，2018．壮药战骨总黄酮提取物经皮给药对大鼠/小鼠的抗炎、镇痛作用研究[J]．中国药房，29(15)：2090-2094.]
ZHANG CL, LIAO GH, LIU X, 1979. *Premna fulva* Craib injection[J]. Chin Trad Herb Drug, 10(2): 27-28. [张超良，廖国辉，刘文侠，1979．战骨注射液[J]．中草药通讯，10(2)：27-28.]